

慢性气管炎实验方法

汇 编

(二)

• 卫生部防治慢性气管炎办公室 编 •

• 人 民 卫 生 出 版 社 •

慢性气管炎实验 方法汇编

(二)

卫生部防治慢性气管炎办公室 编

人民卫生出版社

慢性气管炎实验方法汇编

(二)

卫生部防治慢性气管炎办公室 编

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

天水新华印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 32开本 8³/₄印张 192千字

1981年2月第1版第1次印刷

印数: 1—9,000

统一书号: 14048·3897 定价: 0.62元

前 言

一九七三年我们曾编印了《慢性气管炎实验方法汇编》（一）。几年来，防治气管炎、感冒的科研工作又有一些新进展。为此，我们委托张宝安、陈鸿珊、毛华训三同志组织和编辑了《慢性气管炎实验方法汇编》（二）。本册包括了气管炎、感冒的免疫、病毒、生理生化、病理等方面的一些实验方法，共四十余篇。

本汇编部分文章是几位编者根据各地材料综合、汇总而成，大部分文章系在原稿基础上进行了加工、审理。在收集、整理本汇编的过程中，曾得到许多单位和同志的大力支持；收到各地投寄的大批稿件，但由于篇幅所限，未能全部选入。在此，谨向这些单位和同志表示衷心的感谢。

一九八〇年二月

目 录

I 免疫部分

IgA的测定	(1)
放射性单扩散法测定IgE	(7)
纸片放射免疫吸附试验测定IgE	(17)
慢性气管炎病人血清IgE水平调查	(24)
快速、微量醛化耳垂血IgG火箭免疫电泳定量法	(28)
环状免疫单扩散法	(33)
小白鼠肺巨噬细胞吞噬功能的测定方法	(44)
羊红细胞玫瑰花结试验	(48)
615纯系小鼠脾细胞的玫瑰花结试验	(56)
淋巴细胞转化试验	(61)
移行抑制试验	(68)
间接红细胞凝集试验测定抗DNA抗体	(74)
植物血凝素皮肤试验	(79)
硝基氯苯皮肤试验	(84)
血清杀菌力试验	(89)
C ₃ 提纯, 抗血清制备和测定方法	(92)

II 病毒部分

人干扰素的制备、提纯与效价测定	(108)
人体二倍体细胞培养技术	(122)
流感病毒单放射免疫扩散测定方法	(131)
流感病毒单放射溶血技术	(141)

流感病毒荧光抗体诊断方法	(147)
流感病毒感染小鼠肺重量测定法	(165)
冠状病毒的分离及鉴定	(168)
腺病毒荧光抗体诊断方法	(170)
流感病毒空斑测定和药物抑制试验方法	(177)
流感病毒快速动物试验模型	(187)

Ⅱ 生理、生化及病理部分

血真性胆硷酯酶活力测定法	(194)
血清脂肪酶的测定	(201)
血清淀粉酶和唾液淀粉酶的测定	(203)
血清和痰液乳酸脱氢酶的测定	(210)
痰液神经氨酸的测定	(214)
痰液唾液酸的含量测定	(217)
血清多巴胺- β -羟化酶活力测定	(219)
唾液钠、钾含量及其比值的测定	(224)
尿中 3-甲氧基-4-羟苦杏仁酸含量测定	(226)
尿 17-酮类固醇和 17-羟皮质类固醇的测定	(231)
木糖吸收试验	(238)
血清单胺氧化酶活力测定	(241)
红细胞糖酵解功能的测定	(245)
酶连接免疫吸附测定法	(248)
免疫过氧化物酶技术	(258)
气管、支气管腺体的荧光-Schiff 染色法	(266)
支气管组织肥大细胞的醛复红染色法	(269)

I 免疫部分

IgA的测定

免疫球蛋白A (IgA) 约占全部免疫球蛋白总量的15%。IgA分为血清型和分泌型两种。前者占85%，是由消化道粘膜固有层内浆细胞合成；后者占15%，由外分泌腺及粘膜内浆细胞产生。分泌型IgA是二个IgA单位与一个由粘膜细胞分泌的分泌片结合成的，存在于呼吸道、唾液、鼻腔分泌物、眼泪、胆汁、肠道等处。IgA在呼吸道分泌物中的含量占免疫球蛋白的50%以上。SIgA（分泌型IgA）免疫生物活性包括凝集微粒抗原、中和病毒或抑制其生长、阻塞抗原侵入机体等作用；SIgA比较稳定，又具有抗消化酶和免疫活性的作用，在粘膜面起局部免疫作用，防御细菌及病毒的侵袭。初步实践证明IgA缺乏时，容易诱发呼吸道感染；反之，长期的呼吸道感染又可引起局部SIgA的减少。IgA可反映B细胞产生抗体的能力，且与机体抗御疾病有着一定关系。近年，国内各地广泛开展了对慢性气管炎等病患者体液中的IgA含量的测定。

实验包括以下几个步骤：免疫球蛋白A的提取、提纯、鉴定；抗血清的制备；琼脂免疫扩散板的制备及具体测定等。

体液IgA的测定方法较多，如柱状免疫双扩散法，分光比色法、单向环状免疫扩散法，火箭电泳，免疫扩散同位素

自显影等。其中，单向环状免疫单扩散法是比较简便的，一般实验室均可开展。现就单向环状免疫单扩散法介绍于下。

一、原理

适量的抗原抗体在含电解质和琼脂的解质中扩散相遇，形成抗原抗体复合物。扩散终点的面积或扩散的直径与抗原含量成正比，故测量扩散沉淀面积或扩散环的直径，可求出抗原或抗体的含量。

二、方法

(一) 痰中IgA和血清IgA的测定

1. 材料

(1) 免疫扩散板：生产单位为北京生物制品研究所。本品系用国产优质琼脂，净化后加热溶化，加入一定浓度的马抗人IgA诊断血清，混合均匀，倒板制成。供定量测定样品中之IgA用。

(2) 稀释对照抗原及待检血清：将对照抗原用0.5ml蒸馏水溶解，制备IgA标准曲线稀释成1.25、2.5、5、10、20、40倍（IgA即80、40、20、10、5、2.5单位/毫升），待检血清以生理盐水稀释10倍。

(3) 痰上清液的制备：取晨起痰1~3口，放在青霉素空瓶内，冰箱内冷冻后进行研磨打碎。离心3000~4000转/分20分钟，取上清液或稀释5倍的上清液，备用。

2. 步骤

(1) 加样：打开塑料盒盖，将上述稀释对照抗原分别滴入相应的免疫扩散板一排孔内，其余孔滴加待检稀释血清或痰标本，每个检样加两个孔，每孔滴加10微升，加盖。

(2) 扩散：将塑料盒放进水平湿盒内，放置37℃条件下，48小时观察结果。

(3) 绘制标准曲线：打开塑料盒，在黑背景前对光，测量对照抗原沉淀环的直径，为纵座标；不同单位/毫升浓度为横座标，绘制出标准曲线。

(4) 结果：根据待检标本的沉淀环直径在标准曲线中查出的浓度，再乘以稀释倍数，即为检品中各该Ig的含量（单位/毫升）。

正常值：血清IgA $2.00 \pm 0.51 \text{ mg/ml}$ ($140 \pm 36.0 \text{ Iu/ml}$)
痰SIgA需做治疗前后对照。

3. 注意事项

(1) 免疫扩散板须保存于 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱或阴凉处，为防止琼脂变干失效，必要时可在包装内加湿纱布或湿棉球等。在滴入标本前，如孔内有水份须先吸出，以免稀释标本。有效期：暂定半年。

(2) 加样用的血色素吸管尖端要磨细。取标本20微升，加样到10微升处，动作要慢而且要稳，勿将气泡吹入孔内。

(3) 扩散板放平，以免扩散环偏斜，影响结果的观察。

(4) 各次操作条件要求一致，这样前后结果才有参考价值。

(5) 不同批号扩散板，均需做标准曲线，且每块板应有正常参照，以消除误差。

(二) 唾液IgA测定

1. 标本的来源 留取被观察者的空腹唾液1~2毫升，备用。如不能及时测定，可放 4°C 冰箱保存三天。

2. 制备扩散板 称取1.2克琼脂粉（日本进口，上海分装），加入100毫升生理盐水水浴中煮沸溶解，待其完全溶解后加1%叠氮钠1.0毫升。取琼脂胶12毫升，冷至 $45 \sim 46^\circ\text{C}$ 时

加入效价为 1 : 120 兔抗人 IgA 血清 0.1 毫升，混合后迅速倒入 $5.5 \times 8.5 \times 0.2$ 厘米有机玻璃框内。冬天室温（约 15°C 左右）放 10~15 分钟，夏天放 4°C 冰箱 15~30 分钟后，进行下一操作。

3. 打孔加样 取上述琼脂板，用内径 0.3 厘米钢管打四排十六孔，孔距要相等。按顺序每孔内用血色素吸管加入唾液 10 微升。一般同一标本做双份，以保证结果的准确性。

4. 将加样板放入密闭饱和蒸汽室内 37°C 温箱内，扩散 48 小时后，观察结果。

5. 记录结果 扩散板放入 1% 柔酸中，固定十分钟，显露扩散环，用水洗去多余的柔酸后，用量取扩散环的外直径（毫米），查标准曲线得出单位数，记下结果。扩散环超过 10 毫米者酌情用生理盐水稀释标本 2~5 倍，重做。结果用单位/毫升表示。（正常人在 4 单位/毫升以上供参考）

6. 标准曲线的制备 将北京生物制品研究所生产的 IgA 标准参照品溶解后，稀释成 1.0~10.0 单位/毫升，分别加入扩散板孔中，每孔 10 微升，48 小时后观察结果，量取扩散环外直径，以扩散环外直径或外径的平方为纵座标，不同单位/毫升浓度为横座标，绘制标准曲线。

标准曲线表

单位/毫升	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
扩散环外直径（毫米）	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0

绘制曲线，以扩散环外径或外径的平方为纵座标，单位/毫升为横座标，划曲线。

7. 注意事项

- (1) 需严格按上述条件进行操作。
- (2) 唾液的留取时间要注明，如需前后对照，留取标本时间应大致相同。取标本时，不应有任何刺激。
- (3) 其他注意事项同上。

(三) 脑脊液IgA的测定

系用单向环状免疫扩散法，其操作过程：将一定量的IgA抗血清和琼脂配成一定比例的浓度，浇板打孔。于每孔中分别加入“标准参照血清”的各浓度液及检测样品，置37℃温箱作用24小时，量取沉淀反应环的直径。“标准参照血清”沉淀值绘制曲线，用被检样品沉淀环直径值查表求得结果。

三、结果

1. 血清IgA 正常人群血清IgA的调查，国内报导是较多的，测定范围： $116 \pm 34 \sim 278 \pm 75.4$ 毫克/100毫升血清或 $124 \sim 196.6$ Iu/毫升血清。总之，血清IgA在正常人群中，其含量是在一定的范围之内，各单位所测结果大多一致，并与国际卫生组织所测结果相近似。此外，一些单位一致证明血清中IgA的含量随年龄的增加而增高。关于治疗与指标的关系，目前还未得出明确的结论。

2. 痰液及唾液IgA 国内一些单位证明，痰中SIgA含量一般为 $2.03 \pm 0.21 \sim 5.22 \pm 1.28$ 毫克/毫升，并证明慢性气管炎患者（如急发期、肾虚型）痰内SIgA有降低的趋势。也有一些单位证明，经治疗会有不同程度回升。

3. 鼻分泌液中SIgA 病毒所检查了感冒易感者服黄芪后鼻分泌液中SIgA、IgG含量，发现黄芪可以使IgG明显增高，SIgA含量的变化与感冒之间有着平行关系。例如黄芪

组,服药前后SIgA相差 51.36 ± 11.7 单位/100毫克总蛋白,对照组前后相差 -16.13 ± 6.7 单位/100毫克总蛋白, $P < 0.01$ 。

关于脑脊液SIgA的测定,多用于脑病,故不多谈。

四、评价

几年来,有关血清、痰、唾液等IgA含量的测定,作了大量的工作,血清IgA含量在慢性气管炎病人与健康人之间基本上没有发现显著差别。痰液、唾液SIgA含量的变化,尽管各地结果有着差异,但基本趋势是慢性气管炎病人低于健康人,急发期含量降低,治疗后有回升的趋势。这就说明,测定痰液、唾液等SIgA含量的变化,对探索慢性气管炎的病因、病情、进行疗效判定等,都有一定的参考价值。关于测定结果有偏移或不稳定现象,待方法统一以及标准化以后,这样所得结果价值才会更大。

参 考 资 料

- 1.中国人民解放军总医院:感冒、慢性气管炎、肺气肿、肺心病防治研究资料。
- 2.中国医学科学院医学情报研究所:防治慢性气管炎专题进展汇编。
- 3.全军防治慢性气管炎办公室:慢性气管炎病因研究实验方法汇编。
- 4.卫生部防治慢性气管炎办公室:慢性气管炎实验方法汇编(一)。

中国人民解放军总医院免疫室 乔伯英供稿
中国医学科学院流行病学微生物学研究所 张宝安整理

放射性单扩散法测定IgE

在免疫沉淀反应中，如沉淀物量太少肉眼看不见时，可采用同位素标记抗体并藉助放射自显影法显示出该免疫沉淀物的含量，此法称放射性单扩散法。免疫球蛋白E(IgE)是血清中含量最少的一种免疫球蛋白，在一般健康成人血清中IgE平均含量为0.03毫克/100毫升。因其含量很少，故可用此法测定。放射性单扩散法分为直接法和间接法两种，其基本区别是前者直接标记抗IgE抗体，后者标记第二抗体。现简略介绍间接法的基本原理如下：

将抗人IgE的马血清（第一抗体）掺入琼脂糖平板中，凝固后打孔，各孔加入标准IgE或被测样品，因IgE的浓度较低，用肉眼直接观察或染色法都不能查见所显示的沉淀环，经单扩散后，漂洗平板以去除一切未起反应的蛋白质，然后加入 I^{131} （或 I^{125} ）标记的抗马血清的兔IgG（第二抗体），经保温，充分漂洗，干燥后将其与X光片接触。测定物中的放射性使X光片感光，显影后出现黑色沉淀环。此法比常规单扩散法灵敏，所需抗血清也较少，唯手续较繁，所需时间较长。

一、材料

（一）仪器

1. 标记抗体所需器材

- （1）250毫升玻璃分液漏斗
- （2）玻璃层析柱（ 1×22 厘米）
- （3）尼龙纱（约200目）

- (4) 细塑料管 (内径约为1.5毫米)
- (5) 塑料管用螺旋夹, 铁架, 铁夹等
- (6) 微量加样器 (100微升, 50微升)
- (7) 电磁搅拌器
- (8) 减压抽气机
- (9) EKCO定标器 (或 γ 能谱仪), 井型计数器
- (10) 同位素防护用品 (手套、铅玻璃眼镜、铅围裙

等)

2. 单扩散及滴加标记抗体所需器材

- (1) 电热恒温水浴箱
- (2) 电热恒温培养箱
- (3) 电热恒温干燥箱
- (4) 解剖镜 (带有目镜测微尺)
- (5) 玻板 6×9 厘米
- (6) 微量加样器 (50微升)
- (7) 打孔器 (孔径为 3 毫米)
- (8) 打孔用有机玻璃框架及模板
- (9) 医用X光胶片
- (10) 一般常用玻璃仪器

(二) 试剂

1. 标记抗体所需试剂

(1) NaI^{131} 或 NaI^{125} , 无色透明碘化钠溶液, $\text{pH} = 8$, 无载体。北京原子能研究所出品。

(2) 氯胺T: 北京化工厂出品, 二级纯, 使用时当天配制。

(3) 偏重亚硫酸钠: 北京化工厂出品, 三级纯, 使用时当天配制。

(4) 1%碘化钾溶液：碘化钾为日本进口，由上海化学试剂采购供应站分装，二级纯。

(5) 2%牛血清蛋白 (BSA) 溶液：BSA 为英国进口，将20毫克BSA溶于1毫升pH7.6, 0.05M磷酸缓冲液中。

(6) pH7.6, 0.05M磷酸缓冲液

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)：北京化工厂出品，二级纯。

A液：0.1M，称取6.8克磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 加蒸馏水至500毫升。

B液：0.1M，称取71.7克磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 加蒸馏水至2000毫升。

取A液200毫升，B液800毫升加蒸馏水至2000毫升即为pH7.6, 0.05M磷酸缓冲液。

(7) 葡聚糖凝胶 (Sephadex G25中号)：瑞典进口，由上海化学试剂采购供应站试剂厂分装。

2. 单扩散及滴加标记抗体所需试剂

(1) 抗人IgE的马血清：效价为1:15000

(2) 兔抗马血清中的IgG：抗血清由北京生物制品研究所制备，IgG由本室提取，浓度为20毫克/毫升。

(3) IgE工作标准：751由本室制备，其IgE含量经与世界卫生组织 (WHO) 的参考标准——68/341标定，为2100国际单位/毫升。

(4) pH8.2, 0.05M巴比妥钠-盐酸缓冲液：巴比妥钠，又为二乙基丙二酰缩尿钠 ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2\text{Na}$)，三级纯，北京化工厂出品。

盐酸 (HCl)：二级纯，北京化工厂出品。

叠氮钠 (NaN_3)：英国BDH厂出品，实验试剂。

配方如下：

①原液: pH8.2, 0.2M巴比妥钠-盐酸缓冲液;

巴比妥钠 80.0克

浓盐酸 8.8毫升

叠氮钠 (NaN_3) 4.0克

加蒸馏水至200毫升。

②使用液: pH8.2, 0.05M巴比妥钠-盐酸缓冲液;

原液 (0.2M) 1份

蒸馏水 3份

加叠氮钠防腐最后浓度为0.05%。

(5) 琼脂糖四号: 海燕牌, 青岛海洋渔业公司产品
加工厂出品。

(6) 20%牛血清缓冲液: 小牛血清经 56°C 30分钟灭活
后用pH8.2的0.05M巴比妥钠-盐酸缓冲液配成。

(7) 0.85%氯化钠溶液: 氯化钠 (NaCl), 三级纯,
北京化工厂出品。

(8) 胶片: 上海感光胶片厂出品。

(9) 显影剂: 金星牌, 北京市朝阳区化工厂出品, 显影
温度 20°C 左右, 时间为3~6分钟。

(10) 定影剂: 金星牌, 北京市朝阳区化工厂出品, 定影
温度 $14\sim 24^{\circ}\text{C}$, 时间15分钟。

二、实验步骤

1. 标记抗体的制备 我们采用Hunter和Greenwood所
描述的氯胺T法, 碘化标记兔抗马血清中的IgG, 具体操作
如下:

于 10×70 毫米试管中加入兔抗马血清中的IgG200微克
(0.01毫升)和1毫居里 NaI^{131} , 然后在冰浴中喷射式加入
当天新鲜配制(溶在0.1毫升的pH7.6, 0.05M磷酸缓冲

液中)的氯胺T 0.5毫克,在电磁搅拌器上氧化2分钟,再加入0.1毫升(内含1.5毫克)偏重亚硫酸钠,以终止氧化反应。为测定氧化是否终止,加入1%碘溶液1滴,如未出现棕黄色,说明加入的偏重亚硫酸钠已能使氧化终止(一般按氯胺T的三倍量加入就足够终止氯胺T的氧化作用,否则应再加一些偏重亚硫酸钠,直至棕黄色消失)。

2. 标记抗体的分离 我们采用了葡聚糖凝胶(Sephadex G25)过滤法,具体操作如下:

(1) 葡聚糖凝胶(Sephadex G25)的处理:称取Sephadex G25 5克,浸泡在pH 7.6, 0.05M磷酸缓冲液中约为3~4小时,待其充分膨胀后减压抽气,至不再出现气泡为止(约需30分钟)。

(2) 装柱:用1厘米×22厘米玻璃管层析柱,柱床高度为16厘米,装柱要求垂直。柱下端用装有细塑料管的橡皮塞塞上,在橡皮塞上放一层200目尼龙纱,旋紧螺旋夹,先将少量起始缓冲液(pH 7.6, 0.05M磷酸缓冲液)沿管壁倒入柱中,将处理好的Sephadex G25调成糊状,一次倒入柱中,使其自然下沉。

(3) 上柱:为减少标记抗体的丢失,柱内先加入2%牛血清蛋白溶液1毫升作为保护剂,待其渗入凝胶柱后,从柱的上端用滴管加入碘化反应液,待渗入柱后,经分液漏斗滴加起始缓冲液洗脱。

(4) 洗脱:流速3~4分钟/毫升,每管1毫升,共收集15管分别计数。

(5) 计数用EKCO定标器(或 γ 能谱仪),井型计数器测定每管流出液每分钟的脉冲数(CPM)。第一个放射峰约在5~8毫升,为放射性碘化蛋白峰,第二个放射峰在